

**Université Frères Mentouri Constantine**

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie et Ecologie Végétale

**Master en Biotechnologie et Génomique végétale**

Cours de : Génomique Végétale

**GÉNOMIQUE STRUCTURALE**



# INTRODUCTION



Pour aboutir le séquençage complet d'un génome, on procède à :

Une analyse de la structure physique,

Une analyse de la structure génétique,

Une analyse de l'expression du génome.



# INTRODUCTION

## L'analyse de la structure physique

On cherche :

à décrire l'organisation de l'ADN en termes de :

- \* distance physique,
- \* succession de différents types de séquences, et
- \* distribution et d'empaquetage de l'ADN du génome au sein d'un ensemble de chromosomes.

Les distances exprimées en (pb) ou (nm)

# INTRODUCTION

## L'analyse de la structure génétique

On cherche à comprendre :

- Comment les gènes sont distribués le long des chromosomes ?
- Comment ils ségrégent et se recombinent à chaque génération..

Et conduit à établir des cartes génétiques des chromosomes. Les distances (**cM**) : Aptitude à recombiner

# INTRODUCTION

L'analyse de l'expression du génome

On cherche à analyser :

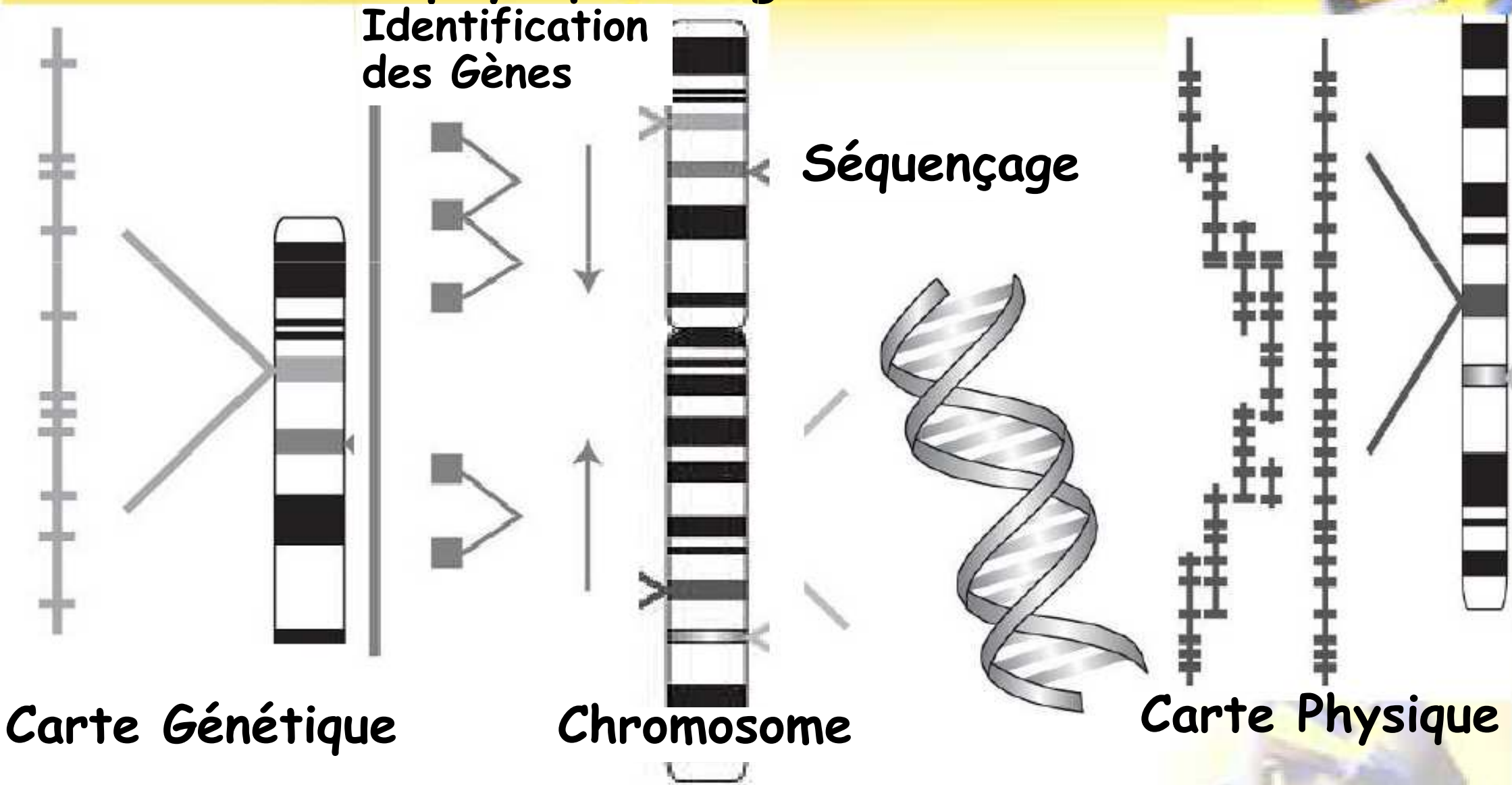
les produits de transcription ou **transcriptomes**,  
ainsi que les produits de traduction ou **protéomes**.

Le résultat de l'activité des enzymes représentées  
dans un protéome sur une variété de substrats  
produit tout un ensemble de molécules organiques  
qui constituent le **métabolome**.



# INTRODUCTION

Les différents niveaux de résolution de la structure physique du génome

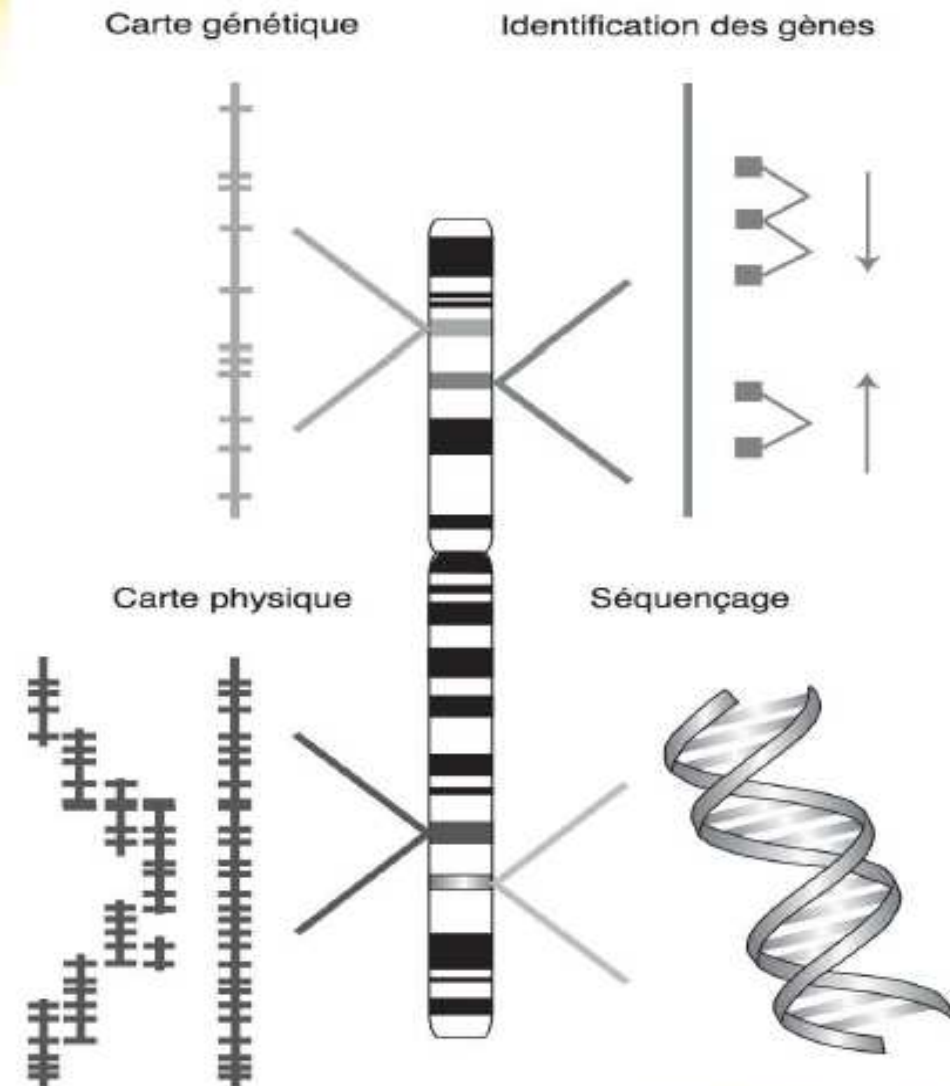


# INTRODUCTION

## Les différents niveaux de résolution de la structure physique du génome

Ces méthodes recouvrent :


- la cytogénétique,
- les méthodes de fractionnement et de cartographies de restriction
- l'organisation de la chromatine.



# INTRODUCTION



Il existe une très grande diversité de types de gènes selon leur **structure**, leur **localisation** et leur **fonction**. On peut citer principalement :

- les gènes codant pour des protéines
  - les gènes codant pour des ARN
  - les pseudogènes
- 



# INTRODUCTION

- les gènes de régulation
- \* les gènes de réplication qui spécifient les sites d'initiation et de terminaison de la réplication de l'ADN,
- \* les gènes de recombinaison qui correspondent aux sites de reconnaissance par les enzymes impliqués dans la recombinaison,
- \* les gènes de ségrégation qui sont les sites d'attachement des chromosomes pendant la mitose ou la méiose.

# INTRODUCTION

A



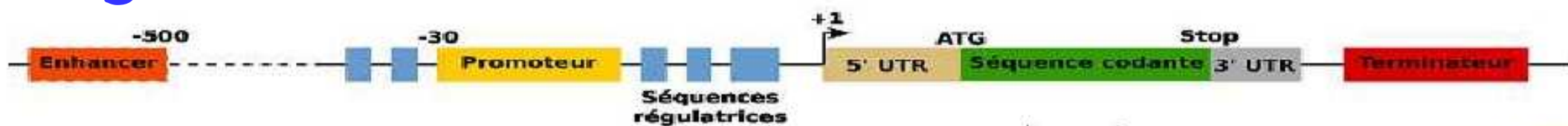
B



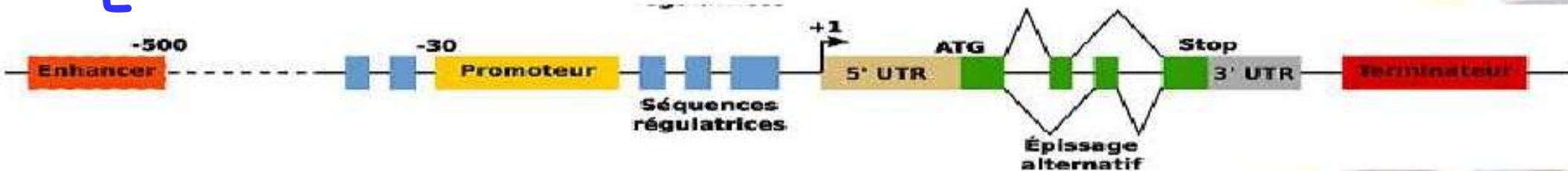
C



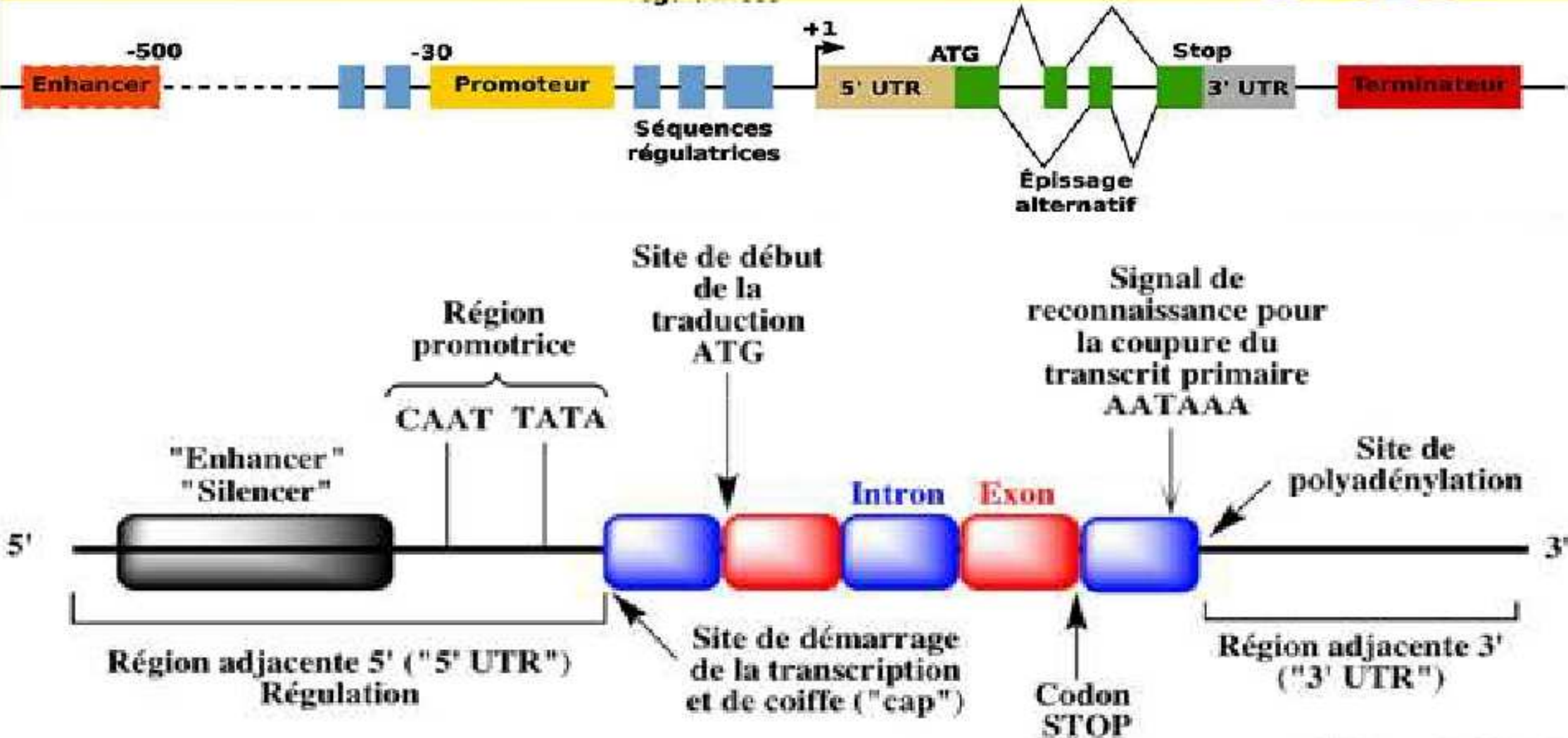
D



E



# INTRODUCTION

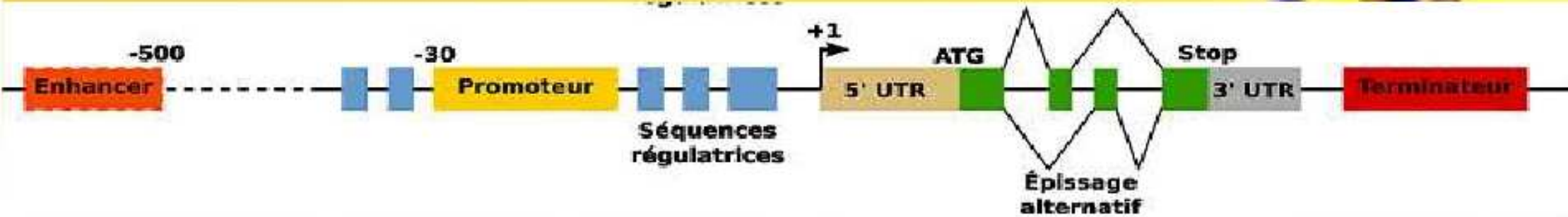


*E. Jaspard (2011)*

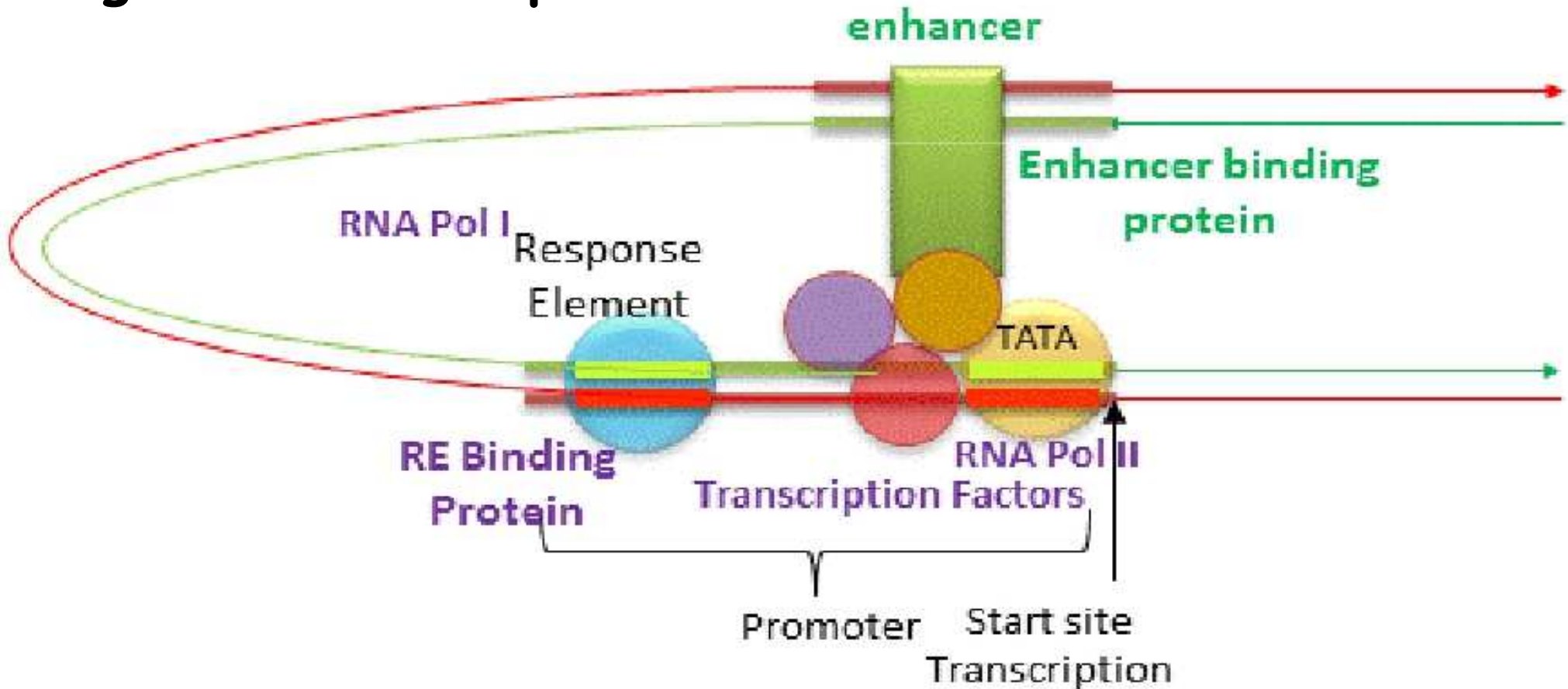
## Structure globale d'un gène EUCARYOTE



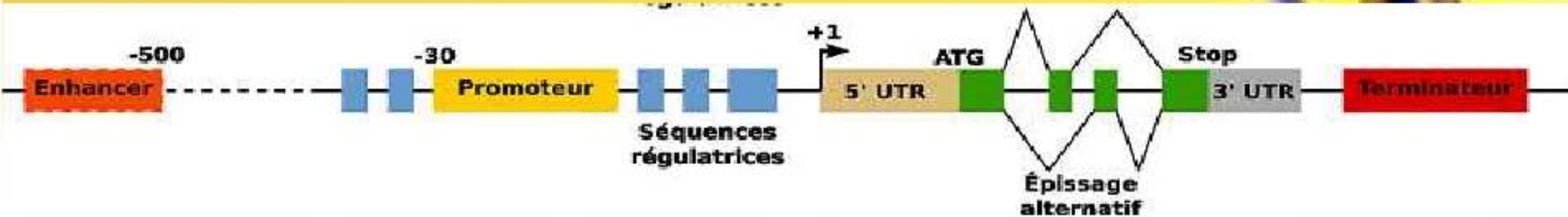
# INTRODUCTION



## Régulation de l'expression



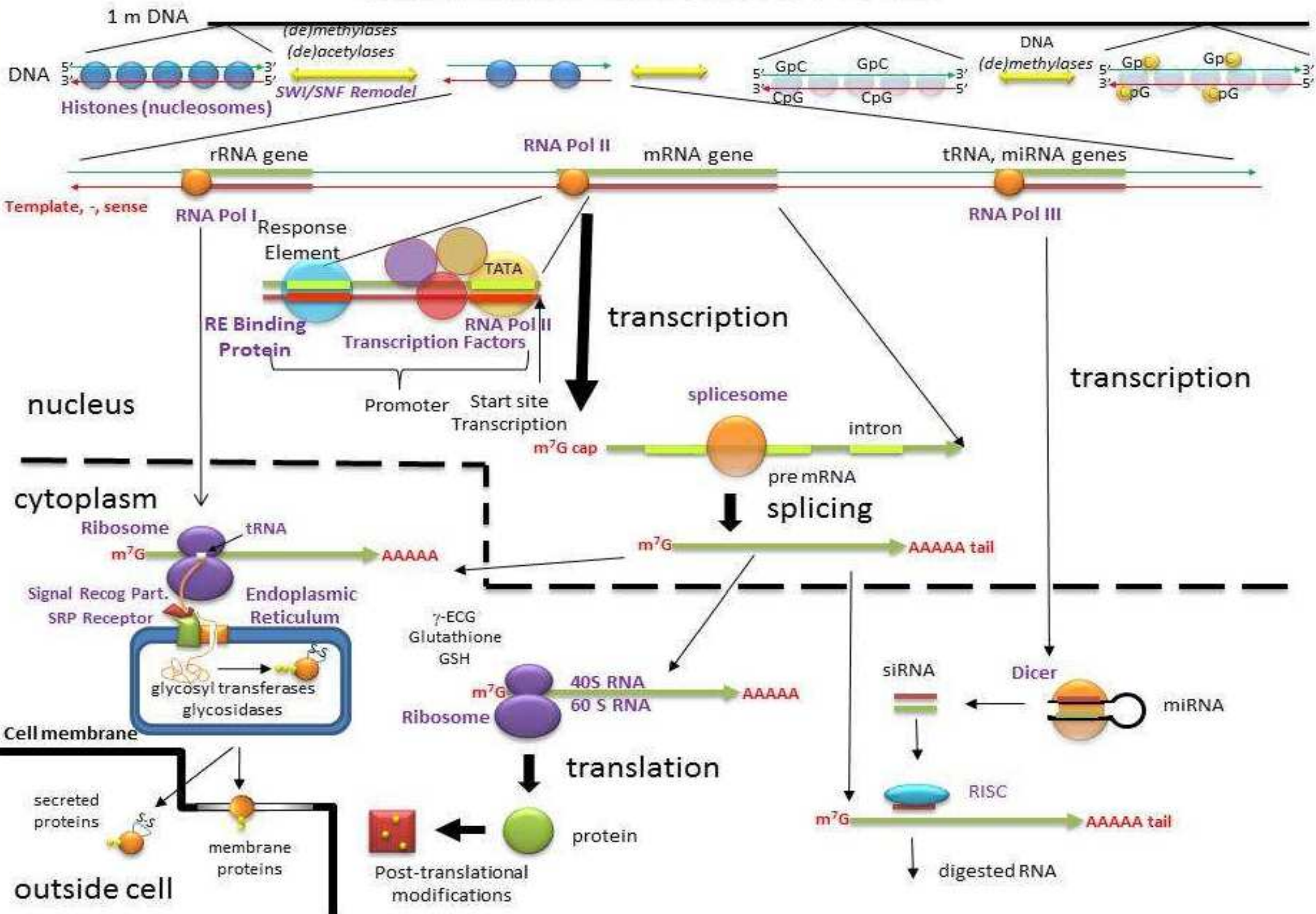
# INTRODUCTION



- La **transcription** s'effectue du **+1** de transcription jusqu'à la région terminatrice,
- La **traduction** s'effectue du codon d'initiation (**ATG/ mét**) jusqu'au codon stop (**TAA, TAG ou TGA**)...
- Les séquences **5' UTR** et **3' UTR** sont non traduites, mais elles jouent un rôle très important dans la régulation et la stabilité de l'ARNm.



# Eukaryotic Gene Expression: An Overview



# 1- ÉTUDE CYTOGÉNÉTIQUE

Le premier niveau d'étude de la structure physique d'un génome est l'observation microscopique.

Elle est réalisée à des stades du cycle cellulaire où les chromosomes sont individualisés (plaque métaphasique des noyaux en mitose) ou décondensés (stades pachytènes et diplotènes de la première division méiotique).

# 1- ÉTUDE CYTOGÉNÉTIQUE

On peut alors dénombrer les chromosomes, mesurer leur taille et observer leur morphologie, localiser la constriction centromérique ou l'organisateur nucléolaire.

La collection de chacun des chromosomes d'une cellule constitue le caryogramme.

# 1- ÉTUDE CYTOGÉNÉTIQUE

Les différentes régions stratégiques du chromosome peuvent alors être décrites : **télomère** à chaque extrémité, **centromère** dont la position va déterminer le type chromosomique..

Ces premières observations révèlent une hétérogénéité structurale des chromosomes.



# 1- ÉTUDE CYTOGÉNÉTIQUE

Les différences de taille dans les génomes des plantes sont devenues évidentes le jour où l'on a su mesurer la quantité d'ADN par noyau, en utilisant soit :

- Des méthodes d'extraction suivies de dosage,
- Des méthodes de cyto-photométrie "Evaluation de la teneur en ADN d'un échantillon sur des noyaux isolés" (**cytométrie en flux**),



# 1- ÉTUDE CYTOGÉNÉTIQUE

Ou sur des préparations microscopiques, après coloration spécifique de l'ADN (réactif de Schiff, DAPI, iodure de propidium, ...) et comparaison avec un standard interne.

La variation des quantités d'ADN par noyaux est sans rapport avec la complexité génétique (le nombre de gènes).

# 1- ÉTUDE CYTOGÉNÉTIQUE

La quantité d'ADN d'un génome est appelée la "**C value**",

La teneur en ADN peut varier, au sein d'une même plante, selon le tissu, ou l'organe examiné.

Les quantités d'ADN par noyaux sont très variable, (de quelques centaines de millions 'pb' à quelques dizaines de milliards).

# 1- ÉTUDE CYTOGÉNÉTIQUE

Tableau : Taille des génomes en millions (pb)

Arabidopsis thaliana	130
Riz	430
Medicago truncatula	650
Brassica oleracea (chou)	700
Sorgho	800
Tomate	1000
Colza	1200
Maïs	2500
Orge	5200
Pois	5000
Blé	16000
Tulipe	30000

# 1- ÉTUDE CYTOGÉNÉTIQUE

Le génome d'une cellule végétale peut en effet subir, au cours du développement, des phénomènes d'**endoduplication**.

(Cas des cellules de l'albumen de maïs, des trichomes d'*Arabidopsis* et des cellules provasculaires "3 ou 4 cycles d'endoreplication").

Ainsi que les cellules du suspenseur de l'embryon chez les Légumineuses.

# 1- ÉTUDE CYTOGÉNÉTIQUE

De nombreuses espèces végétales sont polyploïdes (auto- ou allopolyploïdes) "Colza et blé", peuvent avoir des variations d'un facteur de 2 à 8 dans la teneur en ADN.

La cytogénétique permet aussi de révéler des altérations de la structure d'un génome (translocations, inversions, délétion ou duplications)



## 2- SÉPARATION PHYSIQUE DU GÉNOME

La plupart des êtres vivants contiennent des génomes fragmentés : chromosomes et plasmides bactériens (procaryotes);

Chromosomes nucléaires, génomes chloroplastiques et mitochondriaux, virus etc..., chez les eucaryotes.

## 2- SÉPARATION PHYSIQUE DU GÉNOME

La première étape d'étude d'un génome peut-être de le résoudre en ses composants.

Parmi les techniques utilisées pour analyser de façon globale la structure des génomes et les fractionner en leurs composants, on trouvera :

## 2- SÉPARATION PHYSIQUE DU GÉNOME

Méthodes physiques de séparation des génomes entiers ou fragmentés

a) Séparation en fonction de la taille

Electrophorèse (agarose, acrylamide)

champs homogènes

champs pulsés

Gradients de sédimentation (saccharose)

## 2- SÉPARATION PHYSIQUE DU GÉNOME

Méthodes physiques de séparation des génomes entiers ou fragmentés

b) Séparation en fonction de la forme

Electrophorèse

Gradients de densité (CsCl) + bromure d'éthidium

## 2- SÉPARATION PHYSIQUE DU GÉNOME

Méthodes physiques de séparation des génomes entiers ou fragmentés

c) Séparation en fonction de la composition en base

Cinétique de fusion-réassociation

Gradient de densité (CsCl)

Trieurs de chromosomes + agents fluorescents



## 2- SÉPARATION PHYSIQUE DU GÉNOME

Méthodes physiques de séparation des génomes entiers ou fragmentés

d) Séparation en fonction de la nature Simple ou double brin

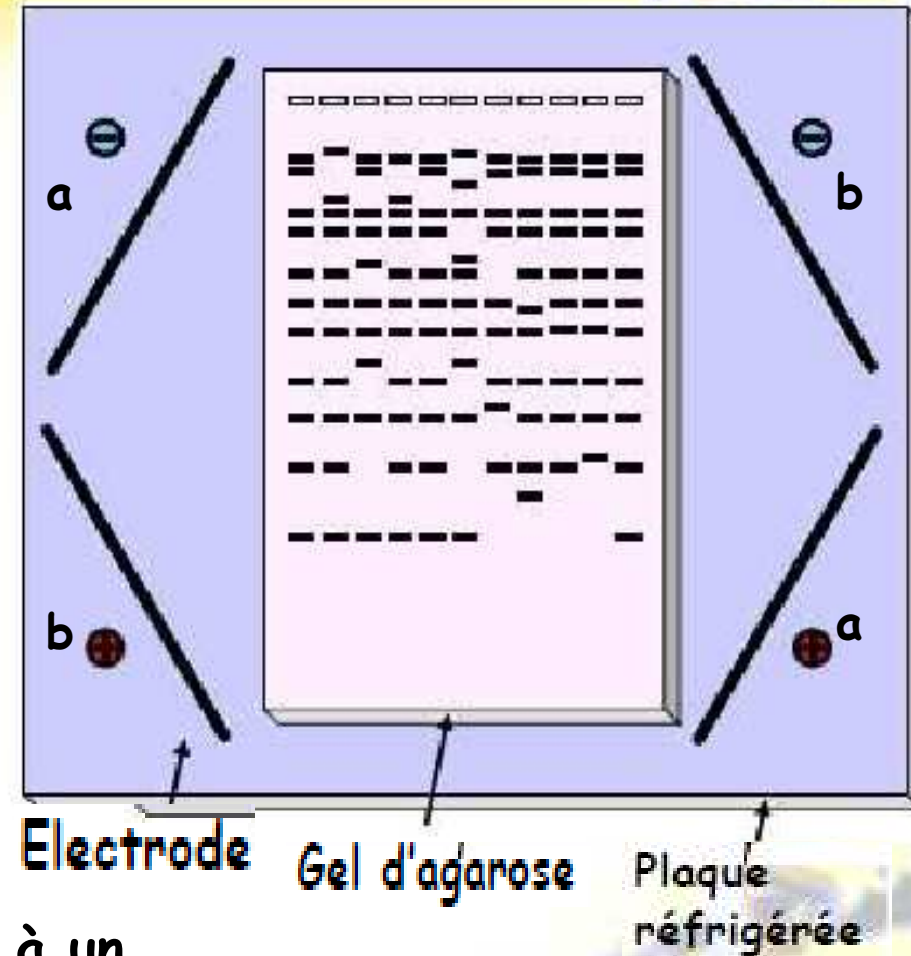
fixation à la nitrocellulose (simple brin) ADN ou ARN

Sensibilité aux nucléases spécifiques

## 2- SÉPARATION PHYSIQUE DU GÉNOME

### a) Séparation en fonction de la taille

Les ADN de grande taille peuvent être séparés sur un gel d'agarose soumis à un champ électrique alternatif (champ pulsé)



Electrophorèse d'AND en champ pulsé (PGFE : Pulsed-Field Gel electrophoresis) Grâce à un minuteur, le champ électrique est appliqué à tour de rôle entre les électrodes a+ et a-, b+ et b-, a+ et a-, etc...

## 2- SÉPARATION PHYSIQUE DU GÉNOME

### a) Séparation en fonction de la taille

Les plus petits chromosomes d'eucaryotes supérieurs dont la taille dépasse la dizaine de Mb ne sont pas résolus par cette technique, de ce fait n'entrent pas dans la maille du gel.

Dans ce cas, il est cependant possible de fragmenter les chromosomes purifiés à l'aide d'endonucléases de restriction à sites rares.

## 2- SÉPARATION PHYSIQUE DU GÉNOME

### a) Séparation en fonction de la taille

(par ex. *Sfi*I = GGCCNNNNNGGCC,  
*Not*I=GC GGCCGC, ...) : les fragments générés  
sont alors séparables par cette technique.

## 2- SÉPARATION PHYSIQUE DU GÉNOME

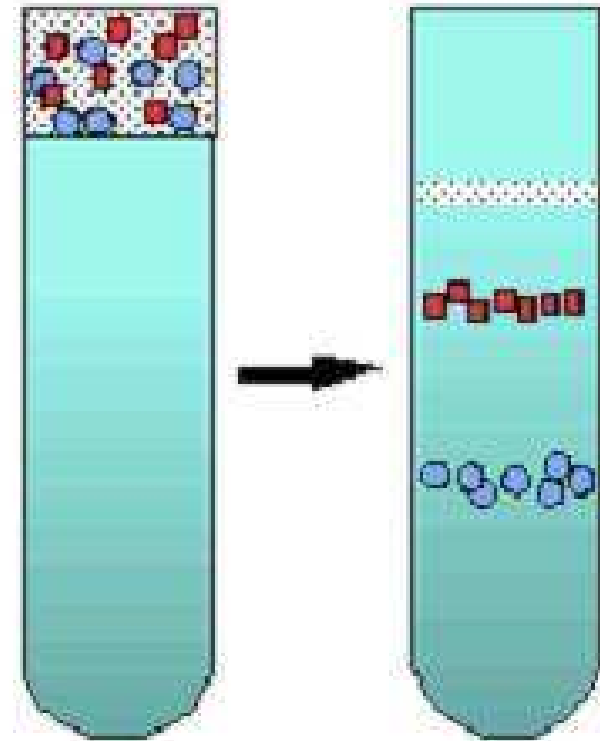
### a) Séparation en fonction de la taille

#### - Gradients de sédimentation (saccharose)

On a souvent recours à un type isopycnique utilisant un gradient discontinu de

Un coussin à haute teneur en sucrose se trouvera dans le fond du tube, avec un coussin de 20% par dessus, puis un coussin de 25%, puis un coussin de 10%.

Les particules qui traversent un coussin pourraient être arrêtées à la surface du suivant.





## 2- SÉPARATION PHYSIQUE DU GÉNOME

### b) Séparation en fonction de la forme

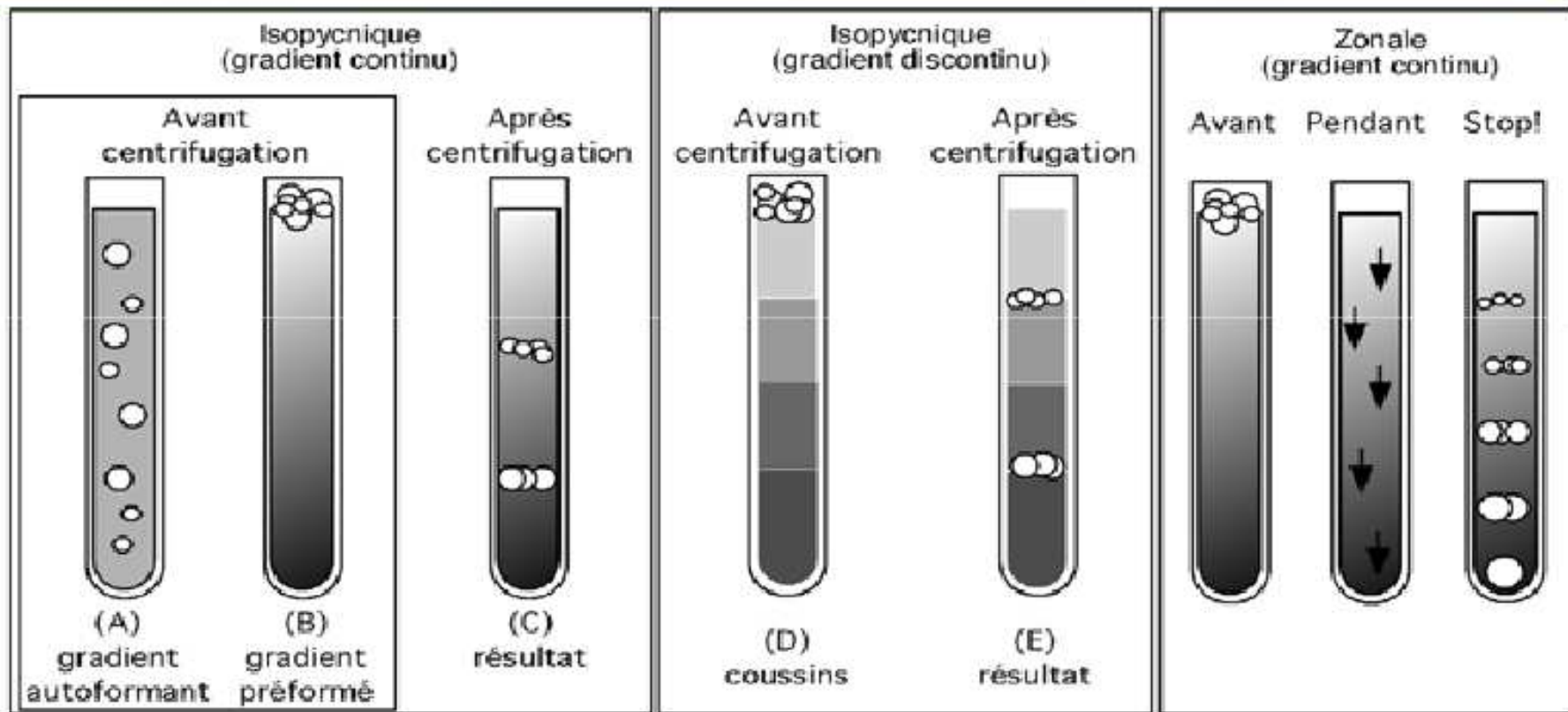
#### - Gradients de densité (CsCl)

Un autre produit couramment utilisé, particulièrement dans la séparation des acides nucléiques, est le chlorure de césium (**CsCl**). Ce sel peut atteindre une densité très élevée, de l'ordre de **1.9 g/ml** à **7.5 mol/l**.

Cette possibilité d'atteindre des densités si élevées en solution aqueuse est son principal avantage.

## 2- SÉPARATION PHYSIQUE DU GÉNOME

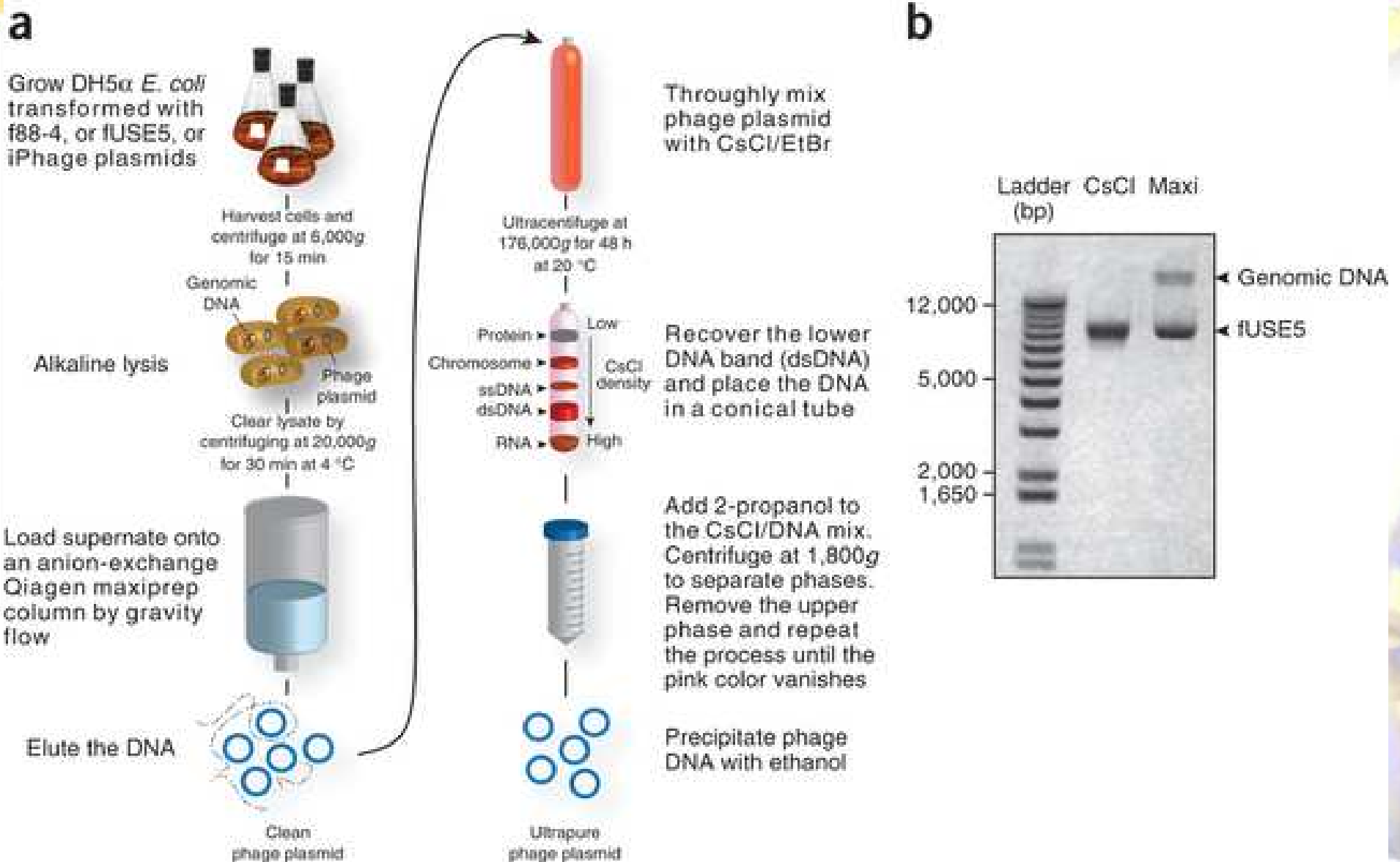
### b) Séparation en fonction de la forme



Différents types de gradients permettant la séparation de particules en fonction de leur densité.

# 2- SÉPARATION PHYSIQUE DU GÉNOME

## b) Séparation en fonction de la forme



## 2- SÉPARATION PHYSIQUE DU GÉNOME

c) Séparation en fonction de la composition en base

- Gradient de densité (CsCl)

La densité de molécules d'ADN est fonction de leur composition en bases : les ADN riches en **GC** sont plus denses que les ADN riches en **AT**.

Il est possible ainsi de séparer par centrifugation à l'équilibre sur un gradient de densité les ADN mitochondriaux et nucléaires.

## 2- SÉPARATION PHYSIQUE DU GÉNOME

c) Séparation en fonction de la composition en base

- Trieurs de chromosomes

Certains colorants ont une affinité pour l'ADN qui dépend de la concentration locale en bases particulières (séquences riches en AT par exemple)..

Les chromosomes, en solution, passent, un à la fois, devant un LASER à émission ultraviolette.



## 2- SÉPARATION PHYSIQUE DU GÉNOME

c) Séparation en fonction de la composition en base

- Trieurs de chromosomes

Un détecteur mesure les intensités des émissions fluorescentes des colorants fixés à l'ADN (à des longueurs d'onde spécifiques de chaque colorant).

Chaque chromosome a un ratio et une intensité d'émission qui lui est spécifique.

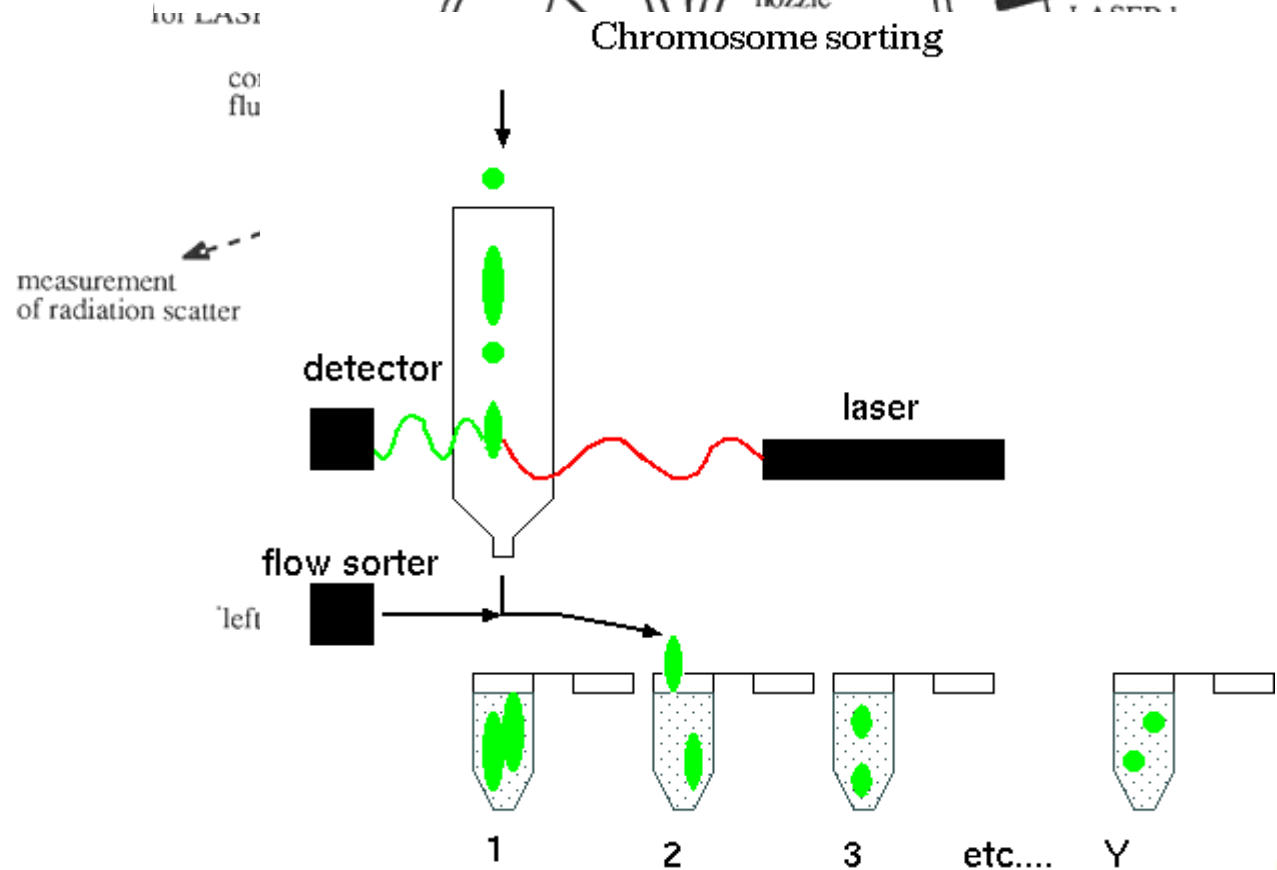
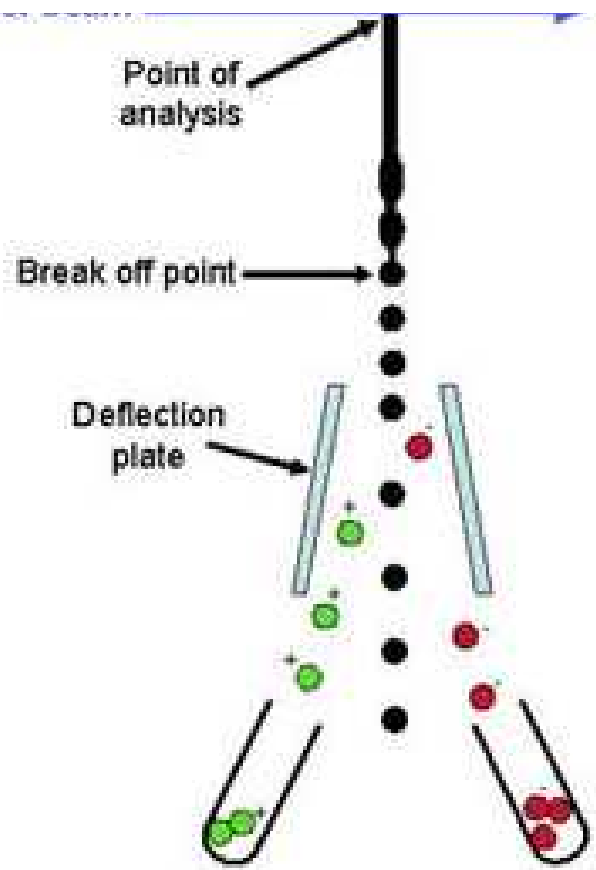
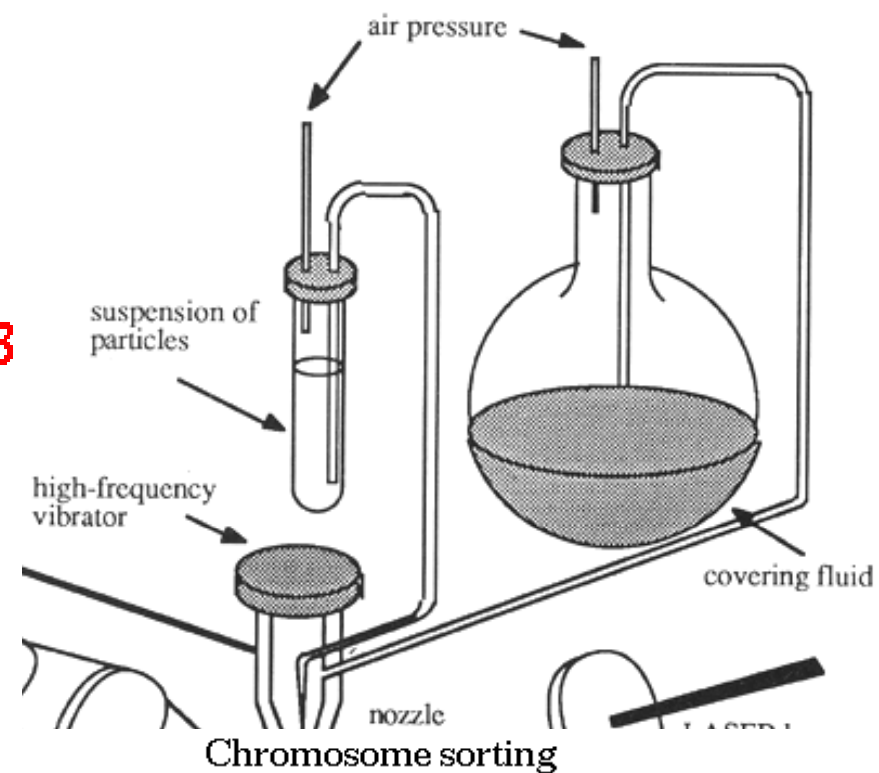
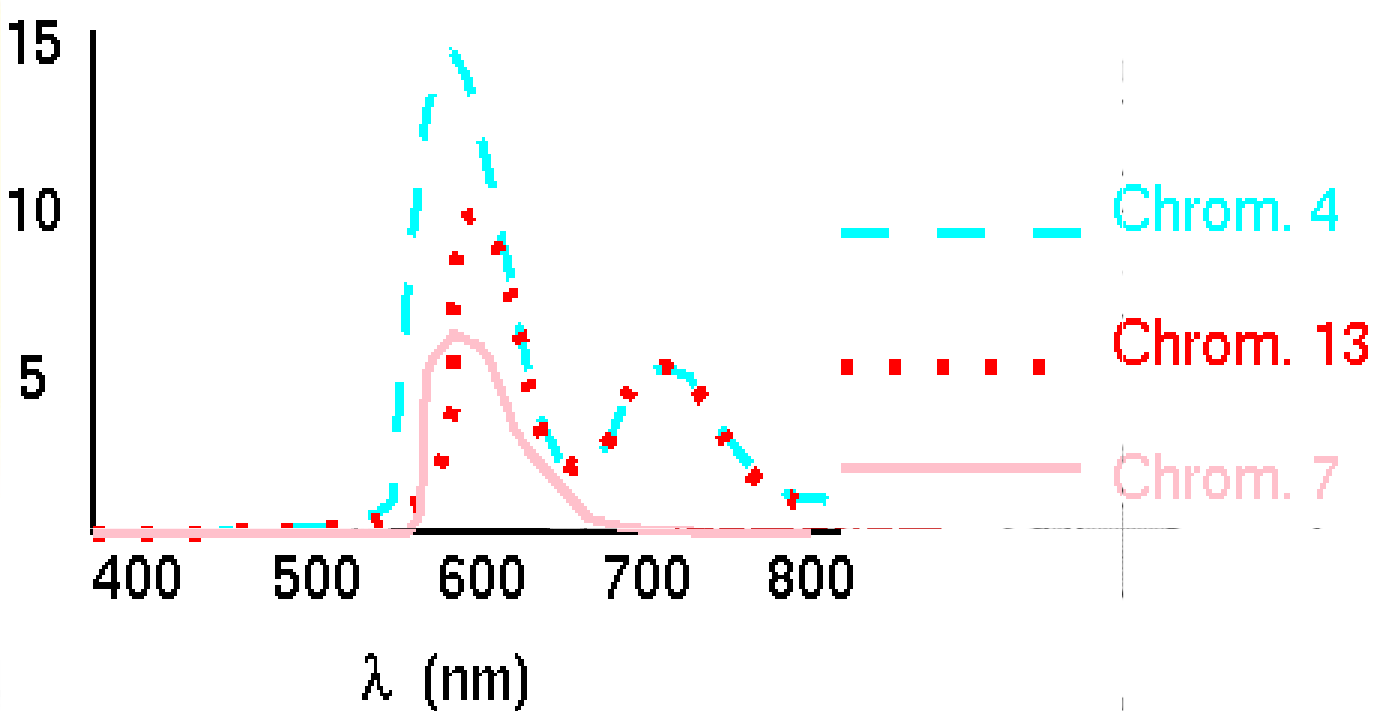
## 2- SÉPARATION PHYSIQUE DU GÉNOME

c) Séparation en fonction de la composition en base

- Trieurs de chromosomes

Les gouttelettes de solution contenant le chromosome cherché peuvent alors être déviées par un champ électrique appliqué au moment de leur passage.

Les deux signaux de fluorescence émis sont mesurés et, s'ils sont dans le bon rapport, un déflecteur est activé et oriente la particule vers le collecteur.



## 2- SÉPARATION PHYSIQUE DU GÉNOME

### d) Séparation en fonction de la nature Simple ou double brin

Les acides nucléiques simple brin s'accrochent spontanément à la **nitrocellulose**. L'ADN double brin s'adsorbe à l'**hydroxyapatite** ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), le simple brin ne s'y adsorbe pas.

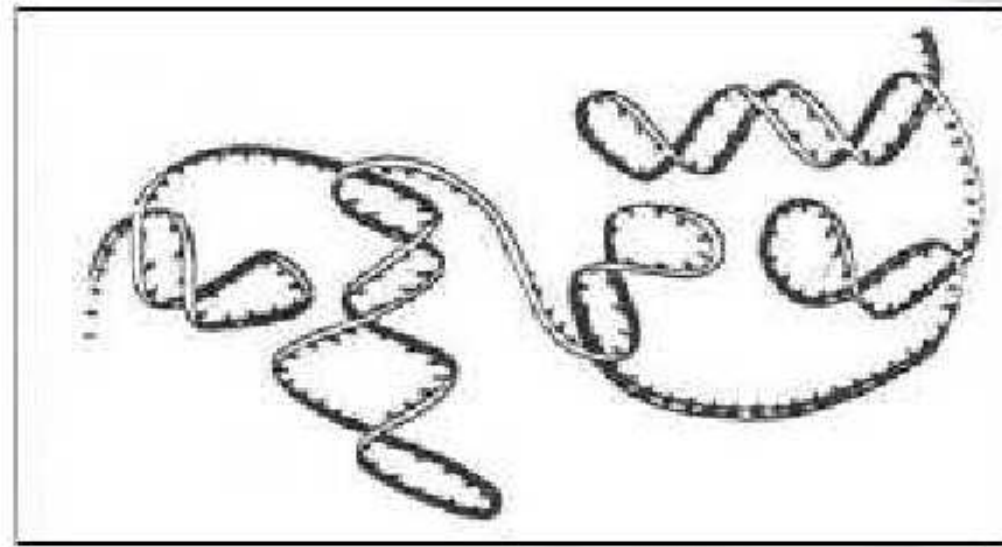
Leur flexibilité étant très supérieure à celle d'une molécule double brin, ils ont tendance à se replier sur eux-mêmes pour former des régions en double hélice irrégulière, qui compactent la molécule.

## 2- SÉPARATION PHYSIQUE DU GÉNOME

d) Séparation en fonction de la nature  
Simple ou double brin

En gel d'acrylamide non-dénaturant, la vitesse de migration des polynucléotides simple brin dépend de leur longueur, mais aussi de la structure secondaire que prennent les molécules.

Exemple de structure d'une molécule simple brin d'ADN ou d'ARN





### 3- ANALYSE DE L'ORGANISATION PHYSIQUE DE L'ADN PAR DES MÉTHODES ISSUES DU CLONAGE DU GÈNE

Fragmentation spécifique des génomes par des enzymes de restriction

L'isolement sous forme purifiée de courtes séquences d'ADN est directement analysables par les endonucléases sites-spécifiques, (enzymes de restriction), ou endonucléases de restriction.

### 3- ANALYSE DE L'ORGANISATION PHYSIQUE DE L'ADN PAR DES MÉTHODES ISSUES DU CLONAGE DU GÈNE

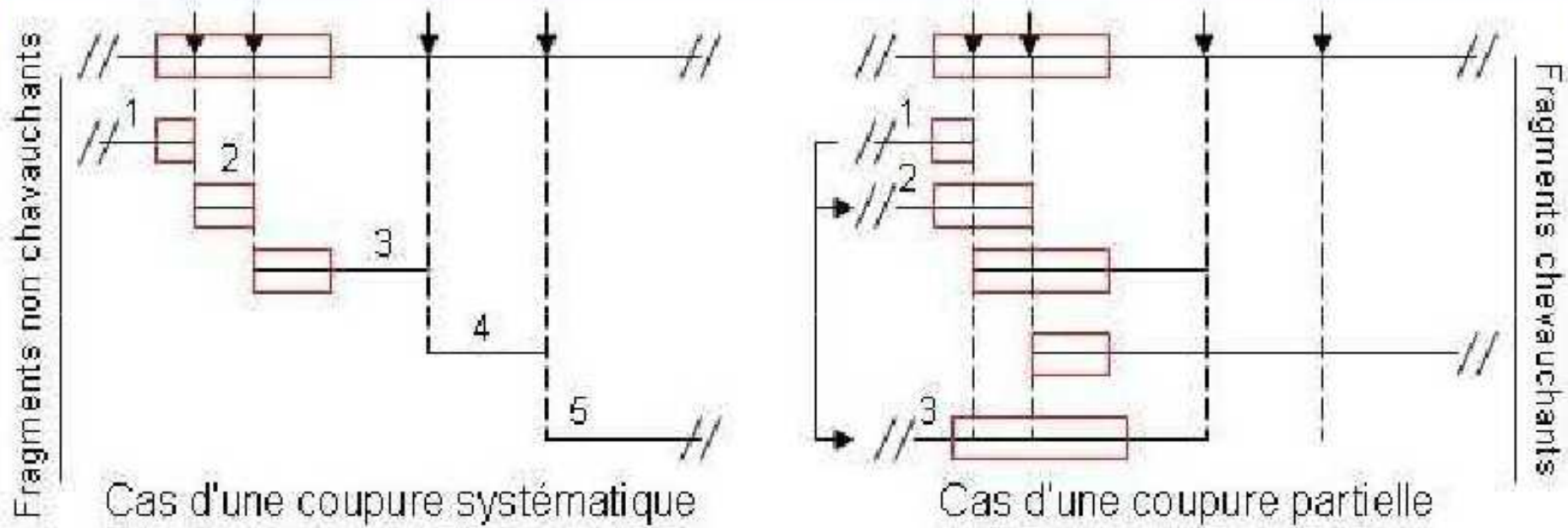
**Fragmentation spécifique des génomes par des enzymes de restriction**

Si on utilise une quantité d'enzyme inférieure à la quantité minimale ainsi définie (ou un temps d'incubation inférieur), tous les sites ne seront pas coupés en une heure.

(Selon les molécules, 0, 1, 2... n sites sont coupés)

Ces conditions de digestion partielle sont recherchées pour générer une série de fragments chevauchants, lors de la construction de banques génomiques.

### 3- ANALYSE DE L'ORGANISATION PHYSIQUES



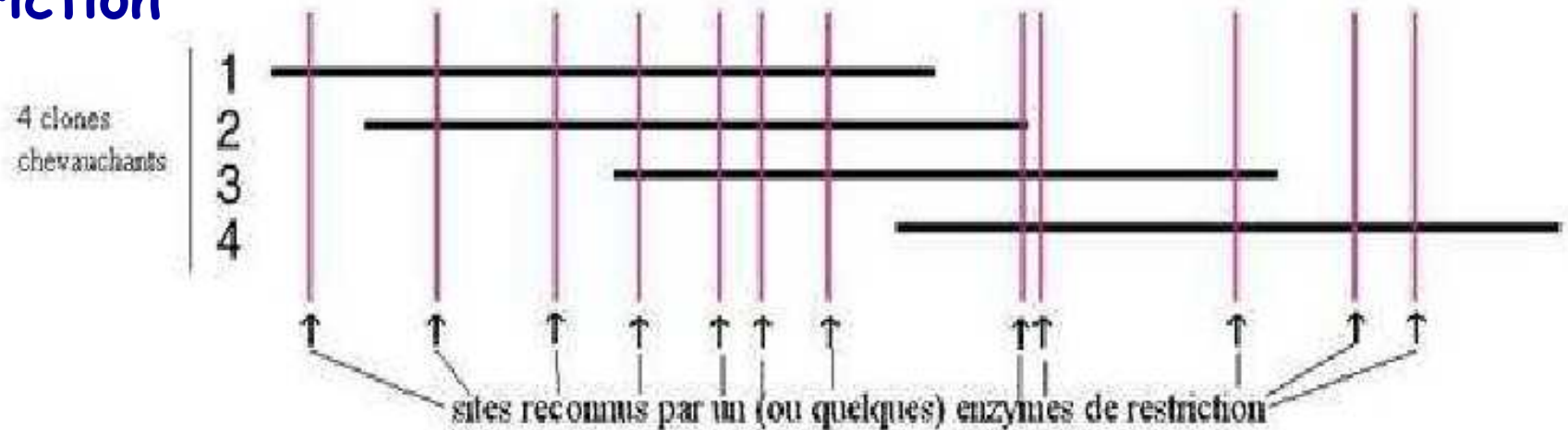
Lorsque l'on fragmente l'ADNg, on choisit une enzyme de restriction à coupure rare, et on la met dans des conditions de digestion partielles.

# 3- ANALYSE DE L'ORGANISATION PHYSIQUES

## Une carte d'éléments contigus



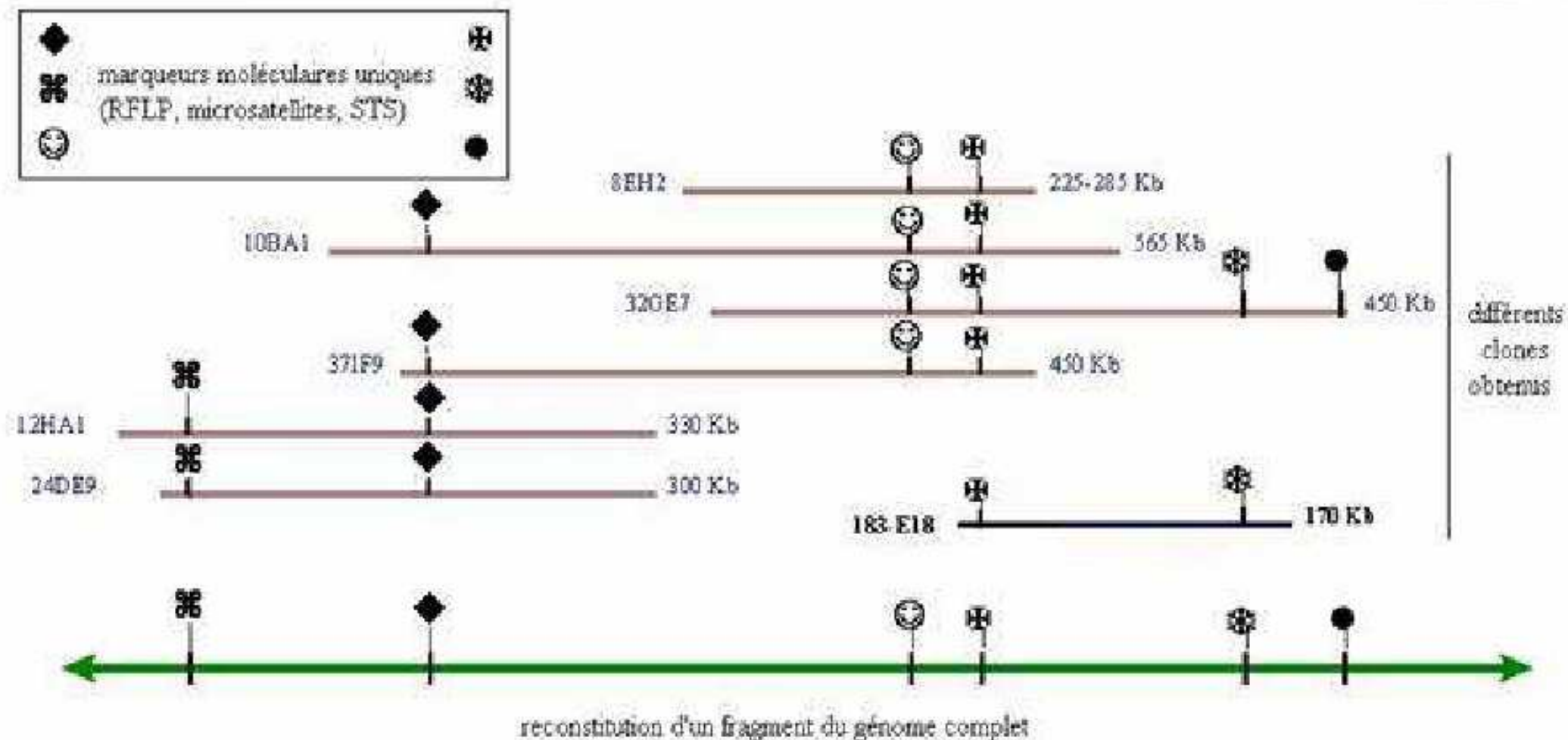
Mise en ordre de 4 clones chevauchants à l'aide de sites de restriction





# 3- ANALYSE DE L'ORGANISATION PHYSIQUES

## Principe de la création de contigs





### 3- ANALYSE DE L'ORGANISATION PHYSIQUE DE L'ADN PAR DES MÉTHODES ISSUES DU CLONAGE DU GÈNE

#### Repérage de séquences spécifiques par hybridation

Dénaturation ou fusion de l'ADN ; On peut rompre les liaisons hydrogènes entre bases appariées d'une molécule d'ADN bicaténaire en chauffant la molécule ou en manipulant les conditions de milieu : solutions alcalines à pH 12,5 avec NaOH, solutions concentrées d'urée ((NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO) ou de formamide (HCONH<sub>2</sub>).

Les molécules simple brin résultantes sont stables tant que les conditions dénaturantes sont maintenues.

### 3- ANALYSE DE L'ORGANISATION PHYSIQUE DE L'ADN PAR DES MÉTHODES ISSUES DU CLONAGE DU GÈNE

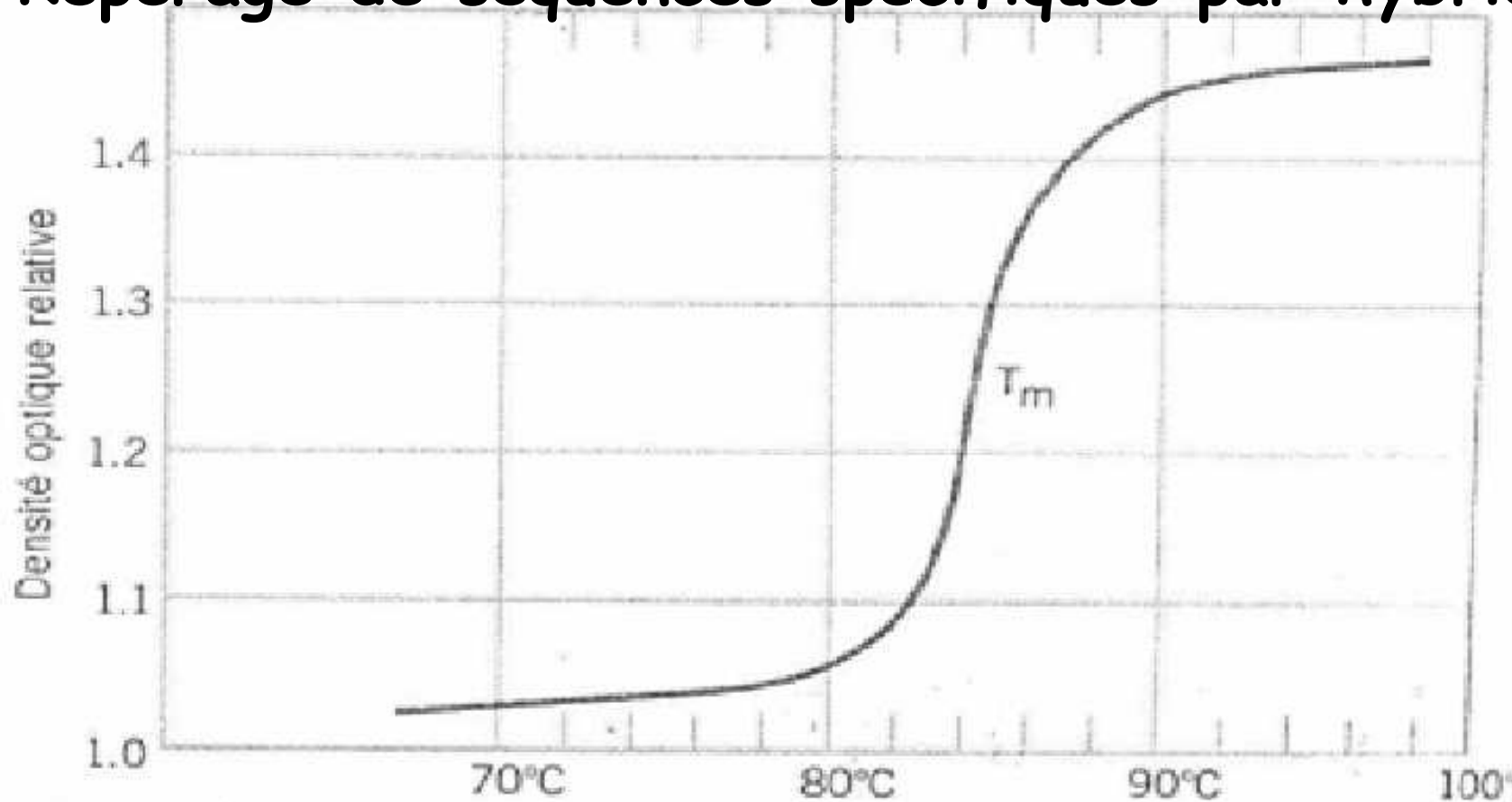
#### Repérage de séquences spécifiques par hybridation

Les simples brins absorbent beaucoup plus les UV que les doubles brins. On appelle hyperchromicité cet effet qui permet de suivre facilement la cinétique de dénaturation d'un acide nucléique maintenues.

### 3- ANALYSE DE L'ORGANISATION

## PHYSIQUE DE L'ADN PAR DES MÉTHODES ISSUES DU CLONAGE DU GÈNE

### Repérage de séquences spécifiques par hybridation



La dénaturation de l'ADN peut être suivie par l'augmentation de densité optique et est définie par la  $T_m$

### 3- ANALYSE DE L'ORGANISATION PHYSIQUE DE L'ADN PAR DES MÉTHODES ISSUES DU CLONAGE DU GÈNE

#### Repérage de séquences spécifiques par hybridation

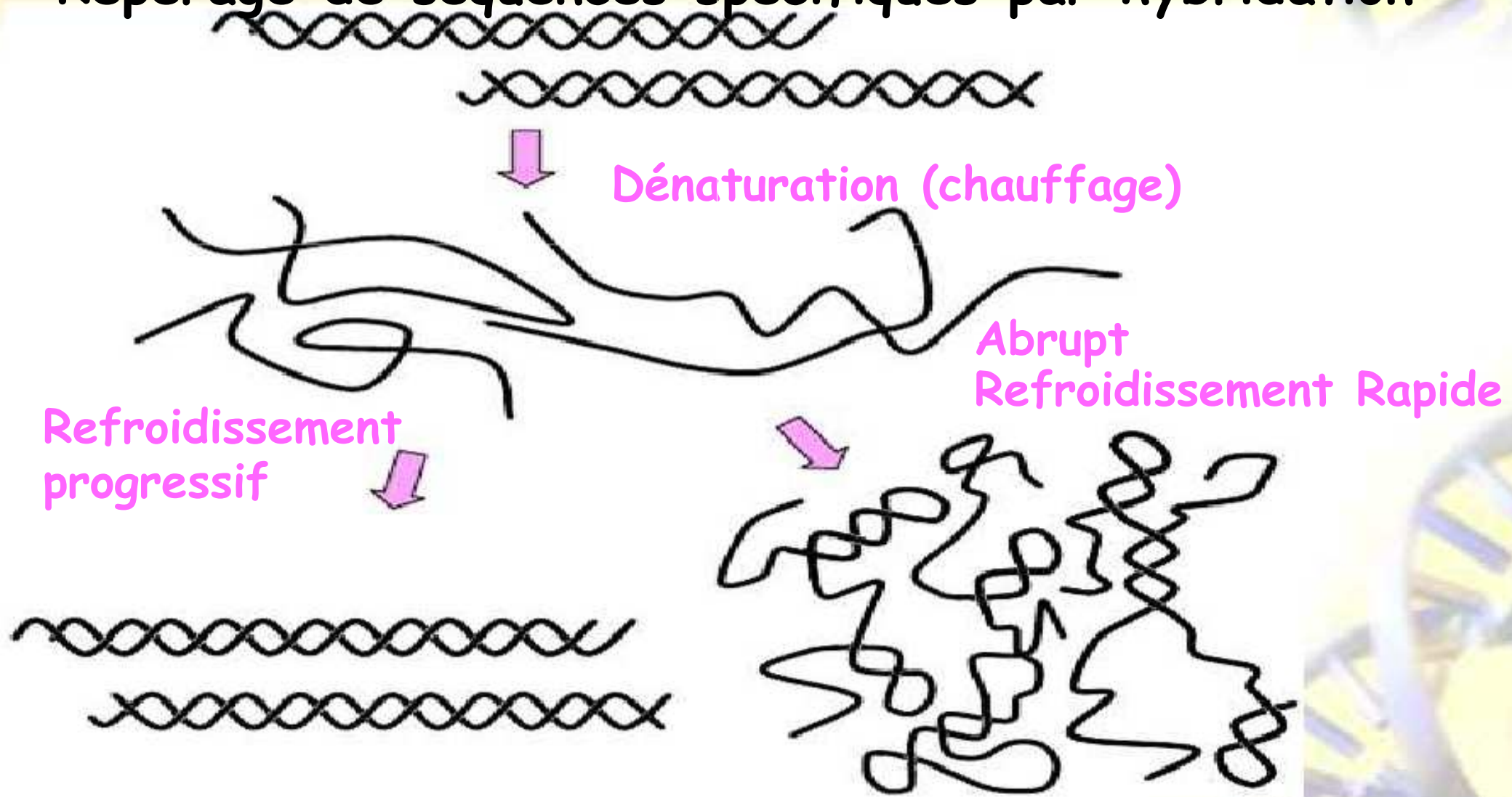
Si on reste "longtemps" autour du  $T_m$  du double brin, les simples brins complémentaires déroulés pourront se rencontrer par hasard, former des appariements transitoires dans les régions les plus stables qui pourront s'étendre à toute la molécule (déplaçant d'éventuelles zones monocaténares en double brin) et refermer la double hélice comme une fermeture à glissière. On dit qu'il y a eu renaturation de l'ADN.

---



### 3- ANALYSE DE L'ORGANISATION PHYSIQUE DE L'ADN PAR DES MÉTHODES ISSUES DU CLONAGE DU GÈNE

Repérage de séquences spécifiques par hybridation





### 3- ANALYSE DE L'ORGANISATION PHYSIQUE DE L'ADN PAR DES MÉTHODES ISSUES DU CLONAGE DU GÈNE

#### Repérage de séquences spécifiques par hybridation

Cette  $T_m$  est établie dans des conditions bien définies de force ionique (en masquant les charges des phosphates, les ions  $\text{Na}^+$  stabilisent la double hélice; si leur concentration s'élève 10 fois, la  $T_m$  augmente de  $16,6^\circ \text{C}$ ) et éventuellement d'agents dénaturants (1 % de formamide abaisse la  $T_m$  de  $4^\circ \text{C}$  environ).

### 3- ANALYSE DE L'ORGANISATION PHYSIQUE DE L'ADN PAR DES MÉTHODES ISSUES DU CLONAGE DU GÈNE

#### Repérage de séquences spécifiques par hybridation

Deux conséquences importantes :

- si la concentration des séquences complémentaires est forte, l'appariement initial se fera très vite (probabilité de rencontre dans une réaction bimoléculaire) : dans un génome complexe, les séquences répétées se renatureront bien plus vite que les séquences uniques : on peut ainsi mesurer la fraction répétitive d'un génome.

### 3- ANALYSE DE L'ORGANISATION PHYSIQUE DE L'ADN PAR DES MÉTHODES ISSUES DU CLONAGE DU GÈNE

#### Repérage de séquences spécifiques par hybridation

Deux conséquences importantes :

- si on ajoute un excès d'une séquence particulière, complémentaire d'une séquence unique d'un génome complexe, la séquence unique du génome s'hybridera plus vite avec la séquence ajoutée qu'elle ne retrouvera son partenaire initial (PRINCIPE DES SONDÉS).

### 3- ANALYSE DE L'ORGANISATION PHYSIQUE DE L'ADN PAR DES MÉTHODES ISSUES DU CLONAGE DU GÈNE

#### Repérage de séquences spécifiques par hybridation

Hybridation sur support : techniques de Southern et de northern

Si la séquence ajoutée est marquée (une sonde), elle permettra de repérer aisément les hybrides. Ce principe est à la base de deux techniques principales de repérage / dosage de séquences particulières :

### 3- ANALYSE DE L'ORGANISATION

### PHYSIQUE DE L'ADN PAR DES MÉTHODES ISSUES DU CLONAGE DU GÈNE

## Repérage de séquences spécifiques par hybridation

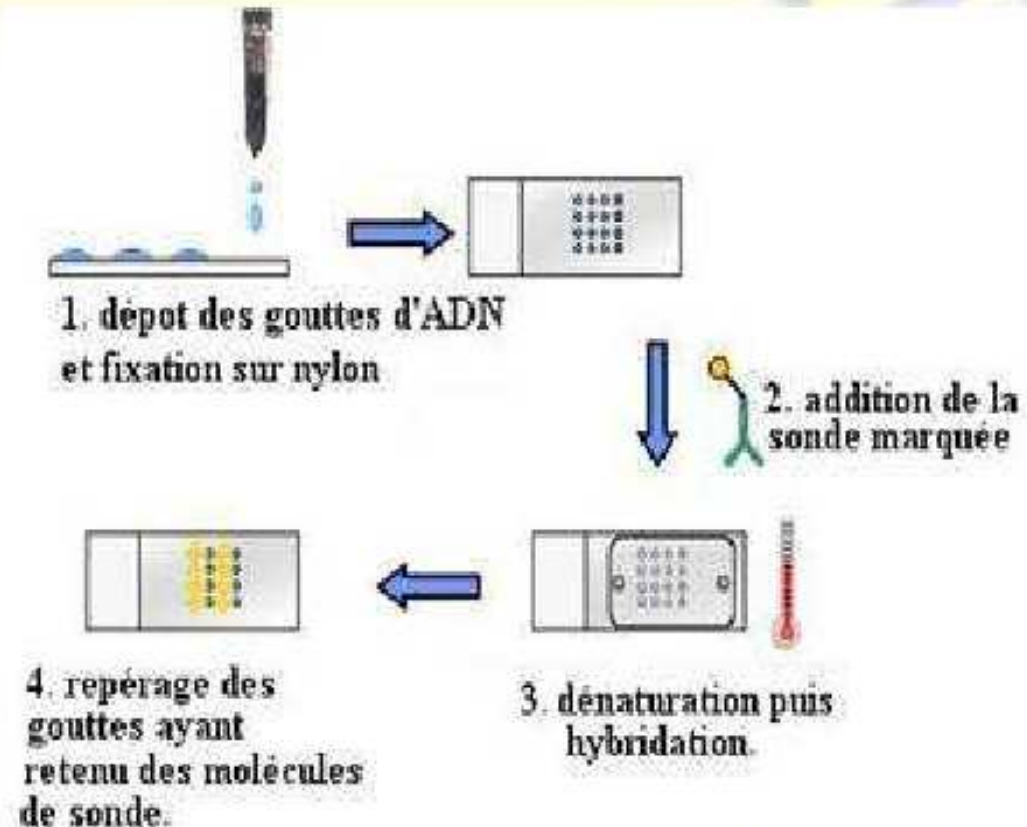
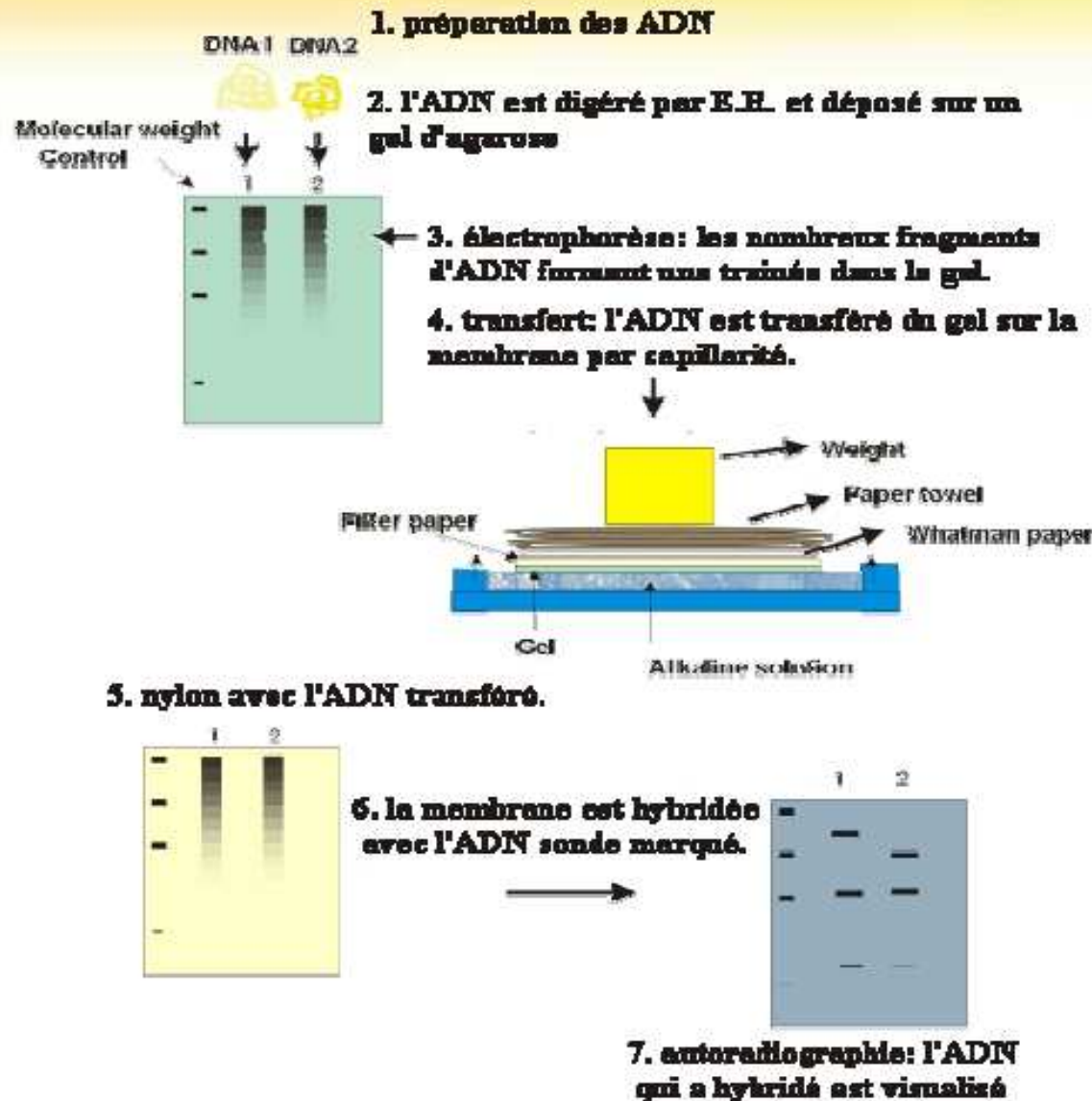
Hybridation sur support : techniques de Southern et de northern

- l'hybridation d'empreintes sur support (après transferts dits de Southern ou Northern). Les acides nucléiques séparés sur un gel d'agarose sont transférés et fixés sur une membrane avant hybridation à une sonde. On parle de Southern blot quand on a transféré un ADN, de northern blot quand on a transféré des ARN (analyse des ARNm).



# 3- ANALYSE DE L'ORGANISATION PHYSIQUE DE L'ADN PAR DES MÉTHODES ISSUES DU CLONAGE DU GÈNE

## Repérage de séquences spécifiques par hybridation



### 3- ANALYSE DE L'ORGANISATION PHYSIQUE DE L'ADN PAR DES MÉTHODES ISSUES DU CLONAGE DU GÈNE

#### Repérage de séquences spécifiques par hybridation

Hybridation sur support : techniques de Southern et de northern

- l'hybridation en tache sur support (dot blot en anglais) :  
une goutte de l'ADN à tester est dénaturée et fixée sur le support, puis hybridée à la sonde.

### 3- ANALYSE DE L'ORGANISATION PHYSIQUE DE L'ADN PAR DES MÉTHODES ISSUES DU CLONAGE DU GÈNE

#### Repérage de séquences spécifiques par hybridation

- l'hybridation sur colonies ou plages de lyse phagiques permet de repérer parmi plusieurs candidats ceux qui portent une séquence particulière : très utilisé pour le criblage des banques.
- l'hybridation en tache (sur ADN ou ARN dénaturés) permet de déterminer la présence d'une séquence particulière dans une préparation.

(Une goutte de la préparation d'acide nucléique en solution est appliquée à la membrane)

### 3- ANALYSE DE L'ORGANISATION

### PHYSIQUE DE L'ADN PAR DES MÉTHODES ISSUES DU CLONAGE DU GÈNE

#### Repérage de séquences spécifiques par hybridation

- l'hybridation sur tissus, sur coupe cellulaire permet de détecter où et quand s'exprime un gène donné en repérant les ARN transcrits grâce à une sonde génique radioactive.
- l'hybridation sur chromosomes en métaphase permet de positionner les gènes sur un chromosome ou de « peindre » des chromosomes en utilisant un ensemble de séquences connues pour être présentes sur un chromosome donné : elles s'hybrideront tout au long de leur chromosome cible.



### 3- ANALYSE DE L'ORGANISATION

### PHYSIQUE DE L'ADN PAR DES MÉTHODES ISSUES DU CLONAGE DU GÈNE

## Repérage de séquences spécifiques par hybridation

#### Sources de sondes :

Toute séquence nucléique peut servir de sonde :

un ARN purifié ou son ADNc peut servir à rechercher les séquences génomiques qui le codent,

un fragment de restriction peut servir à rechercher les ARNm correspondants etc..

une classe de sondes qui s'est beaucoup développée récemment est représentée par des oligonucléotides synthétiques.



### 3- ANALYSE DE L'ORGANISATION PHYSIQUE DE L'ADN PAR DES MÉTHODES ISSUES DU CLONAGE DU GÈNE

#### Repérage de séquences spécifiques par hybridation

=> En pratique, la taille des sondes varie de quelques dizaines de nucléotides à quelques kb.

=> La découverte de nouvelles enzymes de restriction, la possibilité d'effectuer des doubles ou triples digestion et la capacité de repérer les séquences en fonction de leur taille et de leur hybridation allait permettre de dresser des cartes de petites régions de génome, balisées par les sites de restriction.

### 3- ANALYSE DE L'ORGANISATION PHYSIQUE DE L'ADN PAR DES MÉTHODES ISSUES DU CLONAGE DU GÈNE

Le clonage aléatoire de petits fragments d'ADN génomique de plantes, suivi de l'utilisation de fragments clonés comme sonde pour évaluer la distribution des séquences correspondantes dans l'ADN génomique a révélé différents cas de figure :

=> Les fragments révélés sont uniques ou en nombre très limité (révélés par hybridation des sondes fortement radioactives et des temps d'exposition prolongés) ;

### 3- ANALYSE DE L'ORGANISATION PHYSIQUE DE L'ADN PAR DES MÉTHODES ISSUES DU CLONAGE DU GÈNE

=> Les fragments sont en nombre limité, mais révélés rapidement et sans utiliser de sondes particulièrement chaudes ;

=> Les fragments sont en nombre important, mais distincts et distribués selon un profil en échelle dont chaque barreau correspond à une taille multiple de celle du plus petit fragment ;

### 3- ANALYSE DE L'ORGANISATION

#### PHYSIQUE DE L'ADN PAR DES MÉTHODES ISSUES DU CLONAGE DU GÈNE

=> Certaines sondes révèlent des profils d'hybridation mal définis, qui ne sont pas organisées de façon régulière par rapport à des sites de restriction. (effet des éléments transposables et leur dérivés) ;

Un génome peut être complètement cloné dans qq dizaines de milliers de clones BAC ou YAC alors que plusieurs dizaines de millions de phages ou quelques centaines de milliers de cosmides étaient nécessaires avec des fragments de 20 ou 30 kb.

## 4- ÉTABLISSEMENT DES CARTES PHYSIQUES

Le principe de l'établissement d'une carte physique est d'assembler les différents clones YAC ou BAC en séries de clones chevauchants appelés "contigs".

Un premier moyen d'organiser les contigs consiste à localiser un grand nombre de MM sur les YAC ou BAC par PCR.

Ensuite digérer les BAC avec une enzyme de restriction (*Hind* III ou *Eco*R1) et à analyser en parallèle les différents clones.



## 4- ÉTABLISSEMENT DES CARTES PHYSIQUES

La dernière étape consiste à ancrer les contigs sur la carte génétique, les différents marqueurs de la carte génétique sont localisés sur les contigs soit par PCR, soit par hybridation.

Il faut disposer d'une densité importante de marqueurs génétiques séquencés

Des cartes physiques détaillées ont été réalisées pour *Arabidopsis* et le riz. Elles sont ensuite réalisées pour la tomate, la luzerne, ou le peuplier.

## 4- ÉTABLISSEMENT DES CARTES PHYSIQUES

Les programmes de séquençage systématique ont ensuite permis de comparer la distance physique et la distance génétique qui reflète l'activité des mécanismes de recombinaison.

Correspondance entre distance physique et génétique chez différents organismes

Organisme	Nombre moyen de Kbp par cM
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
<i>Arabidopsis thaliana</i>	162
<i>Oriza sativa</i>	270
<i>Drosophila melanogaster</i>	640
<i>Homosapiens</i>	1000
femme	880
homme	1050

## 5- LES BANQUES D'ADN

On ne peut pas isoler un gène directement d'un organisme entier car la quantité extraite sera trop faible. On préfère cribler une banque et trouver à l'intérieur de cette gènothèque la bactérie ou le phage contenant notre gène d'intérêt.

Il existe 2 catégories de banques.

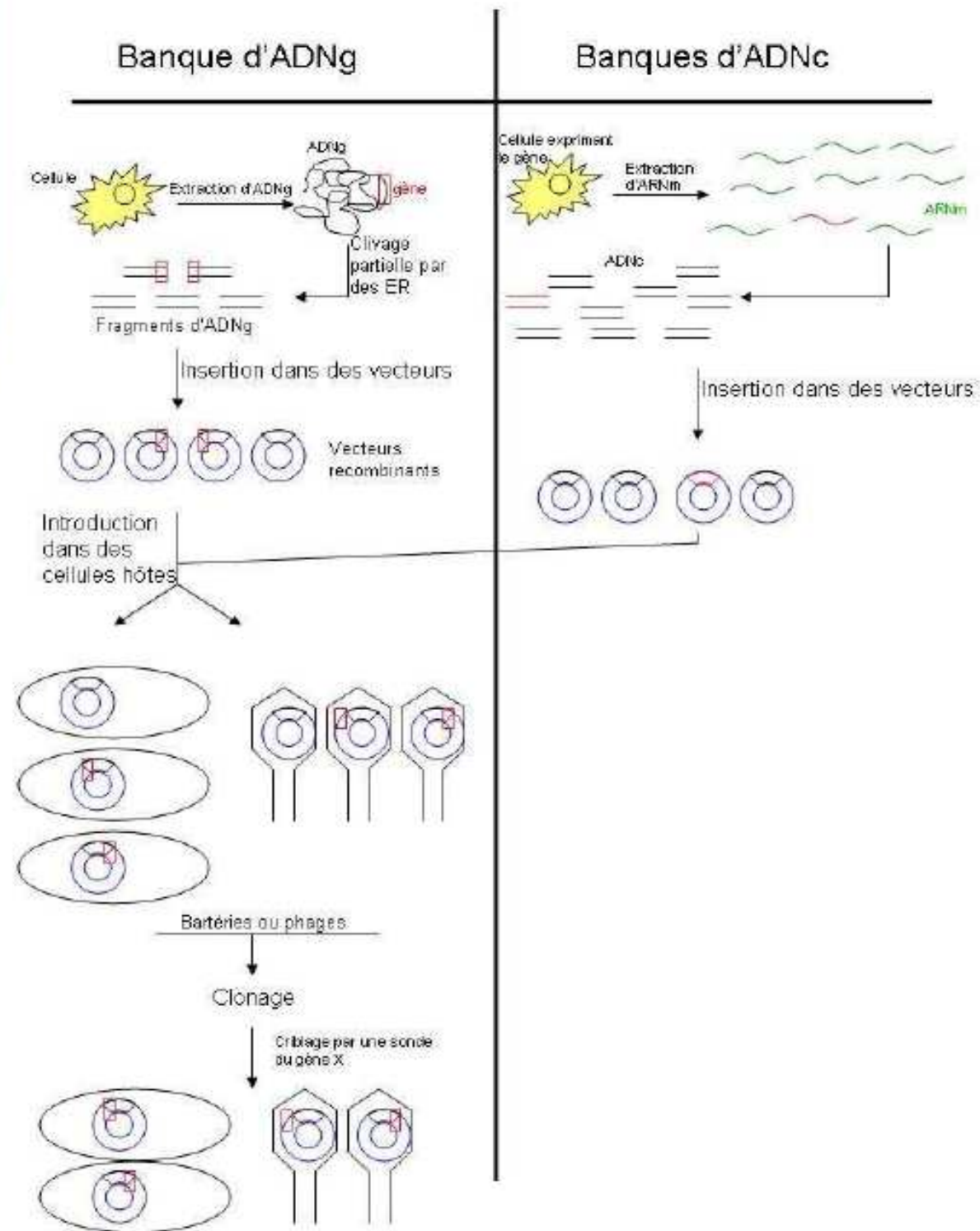
## 5- LES BANQUES D'ADN

C'est une collection de clones de bactéries ou de phage tous différents les uns des autres car contenant des ADN différents.

- la totalité du génome de départ : **ADNg**

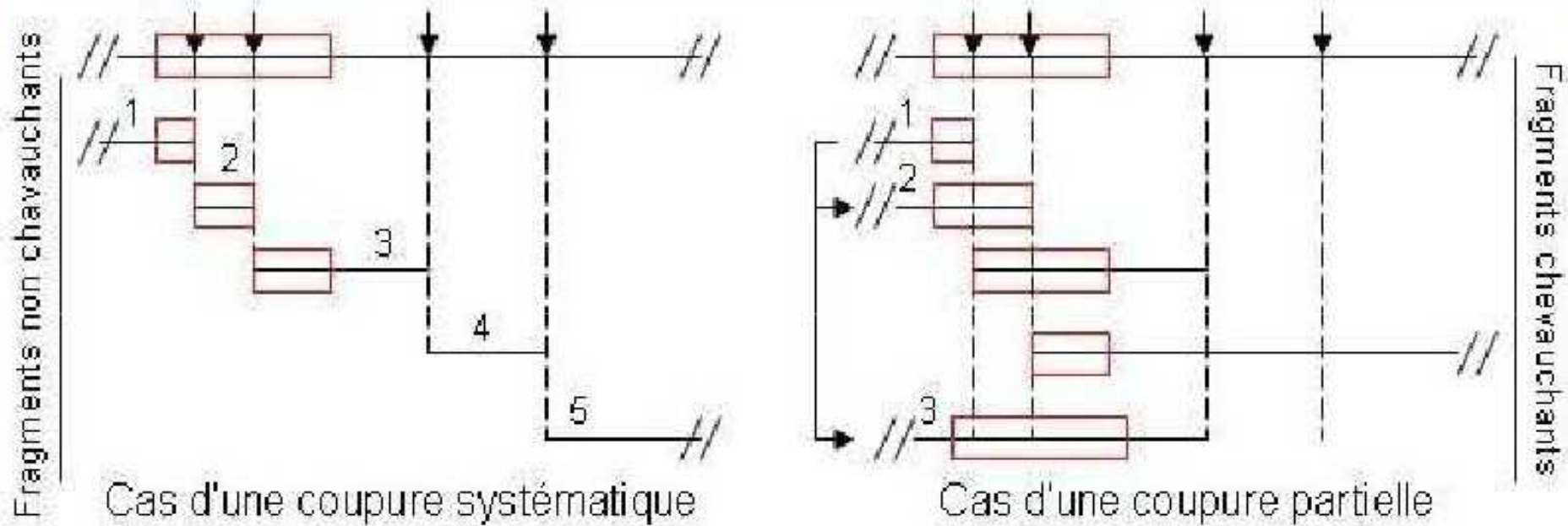
- la totalité des gènes transcrit (=transcriptome)

**ADNc**



## 5- LES BANQUES D'ADN

### Fragmentation de l'ADNg



Lorsque l'on fragmente l'ADNg, on choisit une enzyme de restriction à coupure rare, et on la met dans des conditions de digestion partielles.



## 5- LES BANQUES D'ADN

### Fragmentation de l'ADNg

Ainsi, l'enzyme de restriction coupe différemment les différents exemplaires de l'ADNg étudié, ce qui génère des fragments chevauchants.

Après un premier criblage, le clone un « péché » permet de récupérer par un deuxième criblage d'autres clones ayant des séquences communes avec lui.

Après séquençage de tous ces clones, on peut recoller les morceaux par recouvrement et reconstituer le gène en entier.

## 5- LES BANQUES D'ADN

### Insertion dans les vecteurs

Pour les banques d'ADNg, on utilise 3 catégories de vecteurs différent ayant des capacités de sous clonage différent.

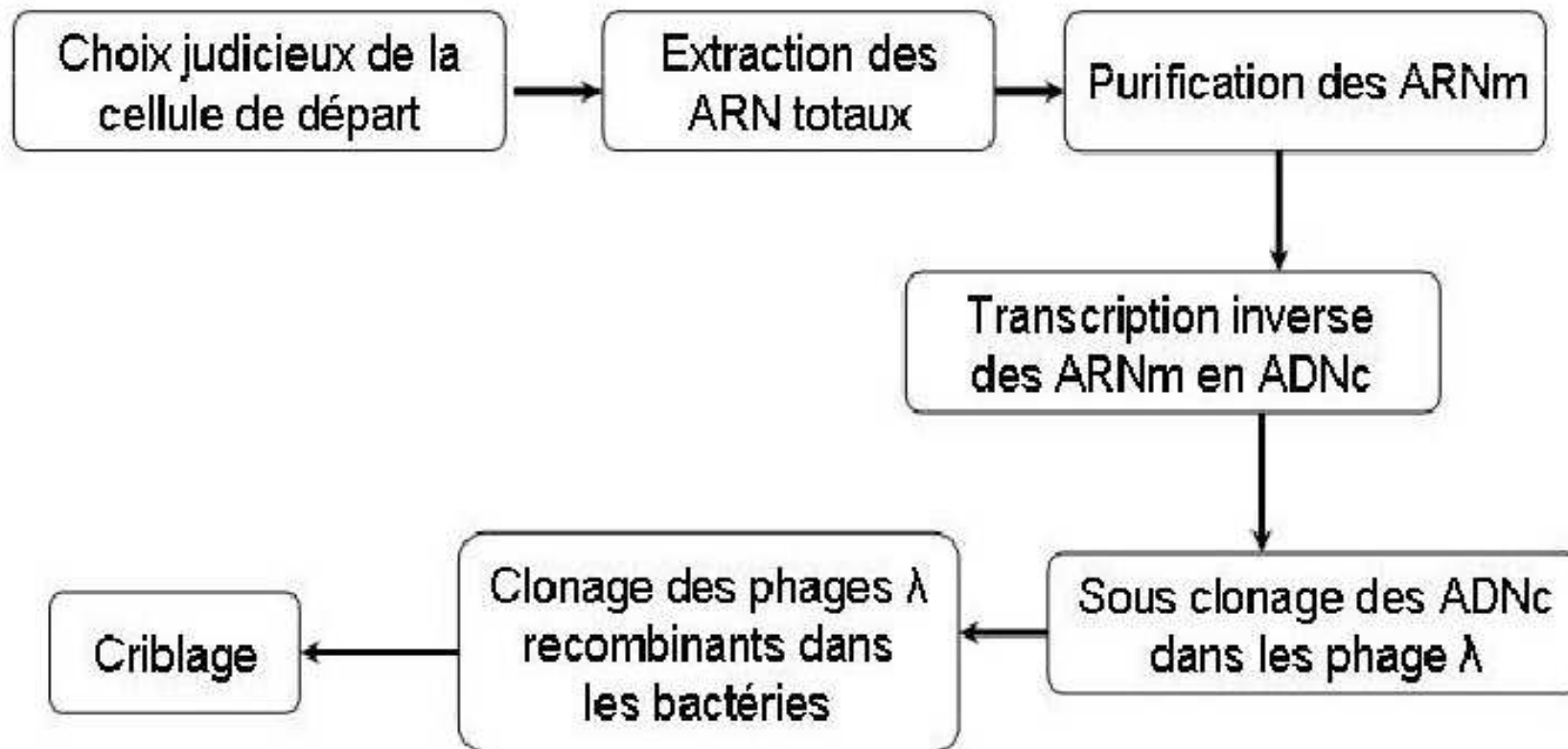
- phage  $\lambda$  - insérer un fragment d'ADNg de 8 à 22 kb
- cosmide - insérer un fragment d'ADNg de 45 kb
- BAC - insérer un fragment de 150 à 350 kb (bactérie)
- YAC - insérer un fragment d'ADNg de 1000 kb (levure)

Les vecteurs des banques d'ADNc sont généralement des phages  $\lambda$  car un ADNc dépasse rarement 10 kb.

## 5- LES BANQUES D'ADN

### Insertion dans les vecteurs

Plus le fragment d'ADNg est gros, moins il y a de clones à cribler dans la banque, et il y a plus de chance que le gène soit en un seul morceau.



## 5- LES BANQUES D'ADN

### Caractérisation des clones

Le but ultime étant d'avoir la séquence complète d'un génome il va falloir séquencer des clones représentatifs mais pas plusieurs fois le même clone

Les clones peuvent être distingués les uns des autres par leurs caractéristiques physiques (la taille par exemple) mais c'est bien insuffisant. Il faut avoir des renseignements sur le degré de ressemblance ou de dissemblance des fragments clonés. Pour cela deux outils sont utilisables : l'hybridation et les cartes de restriction.